Tome 73, nº 3. — Avril 1966

Renversement de l'axe dorso-ventral du nœud de Hensen dans la ligne primitive de l'embryon de Poulet *

par

J. GALLERA et C. DICENTA

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève

Avec 6 figures dans le texte.

INTRODUCTION

De nombreuses et diverses interventions expérimentales ont démontré qu'au moins jusqu'au stade de la ligne primitive achevée le blastoderme d'oiseaux manifeste de grandes potentialités régulatrices. Les expériences de Spratt (1955), de Grabowski (1956) et de Gallera (1964) ont prouvé que l'excision du nœud de Hensen peut être suivie d'une régulation complète. D'autre part, Abercrombie (1950) a obtenu, dans de nombreux cas, la formation d'un embryon normal dans les blastodermes dont le tiers ou même plus de la moitié de la ligne primitive a été retourné de 180°. Il est évident que dans ces conditions la destinée évolutive des différentes régions du fragment retourné a dû être entièrement modifiée. Certes, ce beau résultat ne s'est pas réalisé dans tous les cas. Si le fragment retourné était très grand, il arrivait parfois à maintenir sa polarité primitive.

[1] Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

Pour notre part, nous avons exécuté des expériences similaires consistant à inverser non pas l'axe céphalo-caudal, mais l'axe dorso-ventral du nœud de Hensen.

Dans cette position insolite, le nœud de Hensen peut-il encore s'incorporer au blastoderme et, si oui, de quelle façon? L'orientation des mouvements d'invagination au sein du nœud de Hensen est-elle déjà irréversible? Le neurectoblaste, dont une petite portion peut être entraînée par les mouvements de convergence dans la couche superficielle du nœud de Hensen (Spratt, 1952), est-il susceptible de modifier son mode de développement? C'est pourtant l'évolution de l'endoblaste dans nos conditions expérimentales qui nous intéresse en premier lieu. Grâce aux recherches de Vakaet (1962), de Modak (1965) et de Nicolet (1965), nous savons que l'endoblaste destiné à former l'intestin céphalique s'invagine au niveau de la ligne primitive. Nicolet, en employant méthodiquement la technique des greffes du nœud de Hensen marqué préalablement par la thymidine tritiée, a pu montrer qu'au moins la moitié des cellules de ce nœud sont destinées à bâtir l'intestin. Au stade de la ligne primitive achevée, la plupart de ces cellules n'ont pas encore atteint leur position définitive. Si, après le renversement de l'axe dorso-ventral, les cellules endoblastiques présomptives étaient rejetées du côté dorsal du blastoderme, qu'elle serait leur évolution ultérieure? D'autre part, l'intestin céphalique, privé dans un tel cas d'une source importante de son matériel formatif, serait-il encore capable de se constituer?

Afin d'être en mesure de répondre à toutes ces questions, nous avons complété nos expériences par des échanges du nœud de Hensen par un autre coloré au bleu de Nil et retourné de la même façon que dans nos expériences principales. Dans d'autres expériences, enfin, nous avons appliqué des marques au charbon animal sur la face dorsale du nœud de Hensen renversé.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Des œufs de White Leghorn servent à nos expériences. Les opérations sont pratiquées du côté ventral sur des blastodermes mis en culture *in vitro* selon la méthode de New. Toutes les interventions expérimentales sont faites sur des blastodermes au stade de la ligne primitive achevée.

A l'aide d'une très mince aiguille d'irido-platine (0,02 mm de diamètre), nous découpons un carré de 0,3 à 0,4 mm de côté, englobant le nœud de Hensen; nous le retournons avec une petite anse de sorte que sa face dorsale soit tournée vers l'opérateur. Il faut alors aspirer tout le liquide surnageant à l'aide de minces bandes de papier-filtre. Les blastodermes remis à incuber, nous les observons plusieurs fois et nous les fixons au Bouin au moment où le corps embryonnaire est déjà pourvu au moins de quelques paires de somites. Ils sont colorés *in toto* au carmin aluné, photographiés et débités en coupes sériées qui seront colorées à l'hématoxyline d'Ehrlich-érythrosine.

Afin d'avoir une compréhension plus précise des phénomènes liés au renversement du nœud de Hensen, nous avons dans un certain nombre de cas combiné cette opération avec la coloration vitale au bleu de Nil ou le marquage par le charbon animal. En ce qui concerne la coloration vitale, nous avons appliqué la marque sur le nœud de Hensen *in ovo*, nous l'avons prélevé et substitué à une partie correspondante du blastoderme hôte. Quant au charbon animal, il est apposé sous forme de très fines marques sur la face dorsale du nœud de Hensen renversé, après qu'il se soit incorporé au blastoderme hôte.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous avons exécuté environ 200 expériences de renversement. Le nœud de Hensen parvient à s'intégrer plus ou moins harmonieusement à l'ensemble embryonnaire dans un tiers des cas approximativement. Comme dans un certain nombre de cas les blastodermes opérés dégénèrent précocement, bien que leur cicatrisation ait paru être parfaite, nous n'avons obtenu en définitive que 36 embryons qui ont pu être analysés sur des coupes.

L'incorporation du nœud de Hensen renversé prend en général 2 à 3 heures. Le développement de ces blastodermes présente un net retard, puisque le prolongement céphalique n'apparaît que 6 à 7 heures après l'opération. Sur un embryon fixé après 5 heures nous voyons que le nœud de Hensen maintient toujours sa polarité primitive et que la direction des mouvements d'invagination reste inchangée (voir fig. 1).



Fig. 1.

Microphotographie d'une coupe transversale pratiquée à mi-hauteur du nœud de Hensen renversé. 300 ×.

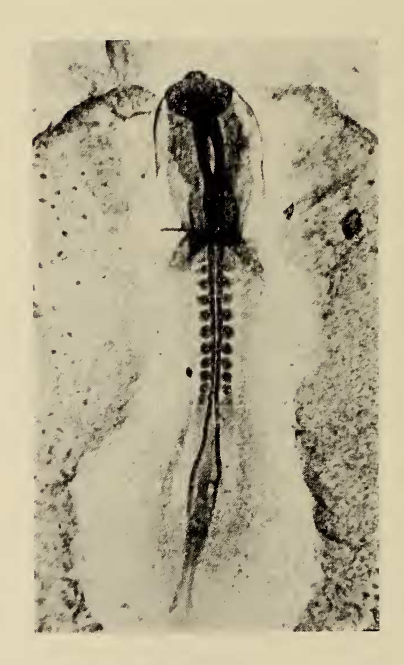


Fig. 2.

Microphotographie *in toto* de l'un de nos embryons, parmi les mieux développés.

Si le nœud de Hensen ne s'incorpore pas au blastoderme, l'excision pratiquée dans ce dernier s'élargit rapidement et le corps embryonnaire ne se forme pas. Cependant, même dans les blastodermes qui ont tout d'abord cicatrisé parfaitement, nous avons parfois constaté l'apparition secondaire d'un petit orifice à côté du nœud de Hensen en recul. Par la suite, cet orifice s'élargit un peu et fend le corps embryonnaire sur une étendue plus ou moins grande. Dans quelques cas, enfin, nous avons observé, après la formation du corps embryonnaire, une zone de nécrose localisée de préférence dans le sinus rhomboïdal.

Sur les 36 embryons qui ont pu être examinés histologiquement, 19 sont presque normaux (voir fig. 2), alors que, dans 17 autres, le nœud de Hensen ne s'est pas incorporé harmonieusement, mais a fourni des ébauches surnuméraires.

Parmi les 19 embryons à peu près normaux, soulignons qu'à l'exception de deux cas où la chorde manquait en avant ou en arrière, la seule anomalie constatée est la présence d'une lacune dans le plancher de l'ébauche neurale. Par cette lacune souvent très étroite émerge un ballon endothélial (fig. 3), situé dans la région



Fig. 3.

Coupe transversale d'un ballon endothélial qui émerge au travers d'un pertuis existant dans le plancher de la gouttière neurale. 150 ×.

troncale ou la région cérébrale postérieure et qui peut se détacher complètement du blastoderme dans quelques cas. Parfois, c'est un amas de cellules très serrées qui fait saillie du côté dorsal et se continue en profondeur dans la masse cellulaire du nœud de Hensen situé maintenant dans le sinus rhomboïdal. Les cellules qui le

constituent sont souvent en train de dégénérer, toutefois si ce processus ne fait que débuter, on distingue encore une mince couche endothéliale à la surface de la masse cellulaire émergeant du côté dorsal.

Dans les 17 cas où le nœud de Hensen n'a pas réussi à s'incorporer harmonieusement dans l'ensemble embryonnaire, nous constatons



Fig. 4.

Coupe transversale de la tête d'un embryon dans lequel le nœud de Hensen renversé a donné naissance à des ébauches surnuméraires, à savoir: une plaquette neurale intercalée dans la voûte de l'intestin céphalique et la chorde dédoublée sur presque toute sa longueur. L'ébauche neurale de l'embryon est scindée à ce niveau en deux moitiés reliées par une membrane d'aspect endothélial. 150 ×.

qu'il a fourni des ébauches surnuméraires et que comme chez les embryons précédents nous retrouvons des cellules endothéliales qui font saillie dans la lumière du système nerveux. Pourtant, la fente existant dans le plancher de la gouttière neurale peut éventuellement s'élargir et nous trouvons alors une mince membrane tendue entre les bords de la lacune mentionnée en lieu et place d'un ballon endothélial (voir fig. 4).

Les ébauches surnuméraires sont représentées soit par de petites plaques neurales, soit des somites ou des tronçons chordaux supplémentaires. Nous avons observé la présence de petites plaques neurales dans 12 cas. Elles sont fortement étirées, surtout dans

leur région postérieure, et sont disposées sous le corps embryonnaire principal, inclues dans son feuillet interne (fig. 4 et 5). Les somites surnuméraires s'intercalent en général entre les deux rangées de

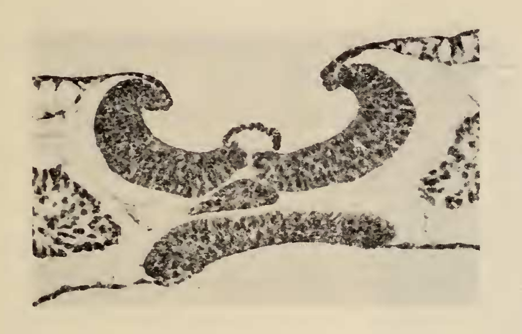


FIG. 5.

Sous la chorde de forme anormale, on distingue la plaque neurale fournie par le nœud de Hensen renversé. Un ballon endothélial fait saillie par un étroit pertuis dans le plancher de l'ébauche médullaire. 150×.

somites normaux. Dans 7 cas, nous avons à signaler un excédent de matériel chordal qui se manifeste soit par la présence d'un court tronçon chordal à côté de la chorde normale, soit par la formation de deux chordes qui ne fusionnent que dans la région postérieure de l'embryon.

Il est intéressant de noter que 7 embryons munis d'ébauches surnuméraires révèlent en même temps de graves déficiences soit dans la région troncale postérieure, soit dans la tête, soit, enfin, dans ces deux régions à la fois. Le plus souvent (6 cas) la chorde n'atteint pas l'extrémité caudale de l'ébauche neurale et se termine par un renflement qui, en se coiffant d'endoblaste, fait protrusion du côté ventral. Chez deux autres embryons, la chorde n'apparaît qu'à la hauteur de l'ouverture de l'intestin céphalique et dans ces deux cas le cerveau est fortement réduit (fig. 6).

Dans 7 embryons la coloration au bleu de Nil s'est maintenue jusqu'au moment de la fixation et nous a permis de faire des observations intéressantes. Deux de ces blastodermes ont formé des embryons plus ou moins normaux. Leurs chordes étaient colorées sur toute leur étendue. L'examen des coupes sériées d'un autre embryon a révélé que la chorde ne s'est pas constituée dans

la tête, et, en effet, au moment de l'apparition du repli cérébral transverse nous avons constaté que la marque bleue n'avait que très légèrement dépassé en avant le nœud de Hensen en recul. Dans trois cas le nœud de Hensen reculait au fur et à mesure de la formation du prolongement céphalique, en entraînant avec lui tout le matériel coloré. Plus tard, nous avons observé une marque bleue, très peu allongée, dans la région somitique de l'embryon. L'examen histologique a montré que dans cette région de l'embryon le greffon a bâti les ébauches surnuméraires suivantes : une petite plaque neurale et des somites médians. Toutefois, dans un autre cas du même genre, la chorde était colorée sur toute son étendue.



Fig. 6.

Microphotographie *in toto* d'un embryon dont le cerveau est sous-induit, conséquence de l'absence de la chorde dans la région céphalique. Derrière le cœur, on aperçoit 3 somites surnuméraires intercalés entre les deux rangées de somites normaux.

Nos colorations vitales semblent donc indiquer que si le nœud de Hensen renversé s'incorpore au blastoderme, il peut fournir la chorde tout entière. En revanche, si le nœud de Hensen renversé maintient son autonomie évolutive, il s'allonge peu et fournit des ébauches surnuméraires. En l'occurence la chorde semble devoir se former, au moins dans sa région antérieure, aux dépens du matériel embryonnaire situé primitivement des deux côtés et en avant du nœud de Hensen. Si c'est effectivement le cas, nous aurions ici affaire au même processus régulateur que nous avons observé à la suite des excisions simples du nœud de Hensen (Gallera, 1964).

Quant à nos marques au charbon, elles apportent une preuve directe de la réalité des deux modes mentionnés ci-dessus de la formation de la chorde chez nos embryons issus des blastodermes dont le nœud de Hensen a été renversé. Les particules de charbon accolées aux cellules superficielles du nœud de Hensen pénètrent,

au cours de l'invagination de ces cellules, en profondeur. Plus tard, à l'examen histologique de nos embryons, nous retrouvons ces particules éparpillées dans la chorde et dans les somites. D'autre part, grâce à un hasard heureux, deux de nos embryons pourvus d'une chorde dédoublée en avant ont été préalablement marqués. Or, dans ces deux cas, ce n'est qu'une branche chordale qui contient les particules de charbon.

DISCUSSION

Nos résultats peuvent être comparés avec ceux d'Abercrombie (1950) dans la mesure où nous obtenons également la formation d'un corps embryonnaire plus ou moins normal dans un assez grand pourcentage. Cependant, l'analyse histologique de nos résultats démontre que, contrairement à ce qui avait été observé par Abercrombie, le nœud de Hensen renversé garde toujours sa polarité initiale. En effet, nous avons toujours retrouvé des cellules de caractère endothélial, qui proviennent sans doute de l'endoblaste du nœud de Hensen, rejetées dans la gouttière neurale. D'autre part, dans les cas où nous avons obtenu de la part du nœud de Hensen renversé la formation d'une petite plaque neurale, celle-ci était toujours située ventralement et intercalée dans le feuillet interne du blastoderme. Nous voyons donc que le nœud de Hensen renversé garde sa polarité primitive puisque le neurectoblaste se retrouve en bas et l'endoblaste en haut. Quant au matériel chordal et, éventuellement, une petite quantité du matériel somitique présomptif, ils se retrouvent simplement inversés dans le feuillet moyen du blastoderme après notre intervention.

Les colorations vitales et les marques au charbon animal ont montré que ce matériel embryonnaire peut participer à la formation de la chorde et des somites. Ces derniers sont toujours orientés normalement par rapport au blastoderme, ce qui ne nous surprend pas puisque dans nos expériences plus anciennes (Gallera et Ivanov, 1964) nous avions constaté que les greffons nodaux transplantés sur l'aire opaque, où ils ont été appliqués la face ventrale contre l'ectoblaste, ont fourni des somites dont la plaque dermique a été toujours orientée normalement par rapport au blastoderme hôte.

Il importe encore de rappeler que l'excision simple du nœud de Hensen n'empêche nullement la formation d'un corps embryonnaire normal, à la condition évidemment que la blessure, pratiquée dans le blastoderme, se cicatrise. Il est fort probable que des processus régulateurs du même genre jouent aussi un certain rôle dans nos expériences présentes. En effet, il serait difficile d'expliquer d'une autre manière le fait que l'intestin céphalique de nos embryons est en général parfaitement développé. Il nous semble inconcevable que le nœud de Hensen renversé, lequel, comme nous l'avons vu, maintient sa polarité et rejette de l'endoblaste sur la face dorsale du blastoderme, puisse encore participer à la formation de l'intestin céphalique. D'autre part, rappelons que certains de nos embryons ont fourni du matériel chordal et somitique en quantité dépassant la norme (dédoublement de la chorde sur presque toute sa longueur, présence de courts tronçons chordaux à côté de la chorde normale, formation de somites surnuméraires). N'oublions pas pourtant, que, dans quelques autres cas, nous avons, au contraire, observé une déficience de l'ébauche chordale, en particulier dans la région troncale postérieure. Il est intéressant à noter que dans presque tous ces cas le nœud de Hensen renversé reculait, sans s'allonger appréciablement, jusqu'au niveau des premiers somites troncaux où il a donné naissance à la formation des ébauches surnuméraires, en particulier d'une petite plaque neurale intercalée dans l'endoblaste. Il paraît probable que c'est cette dernière qui a arrêté le nœud de Hensen en recul et a empêché l'élongation suffisante vers l'arrière du matériel chordal fourni par lui.

En conclusion, nous nous croyons autorisés à affirmer que le nœud de Hensen renversé participe à la formation de nos embryons, mais, d'autre part, notre intervention expérimentale éveille, quoique dans une mesure variable selon les cas, des capacités régulatrices latentes du matériel groupé primitivement au voisinage de l'extrémité antérieure de la ligne primitive.

RÉSUMÉ

Sur des blastodermes de Poulet transplantés en culture *in vitro* au stade de la ligne primitive achevée, nous excisons le nœud de

Hensen et le retournons *in situ* de telle sorte que son axe dorso-ventral soit renversé.

Dans un certain nombre de cas, le nœud de Hensen fut coloré au bleu de Nil ou marqué au charbon animal.

Il s'est avéré que l'axe dorso-ventral est à ce stade déjà déterminé. Toutefois, malgré notre intervention, un corps embryonnaire plus ou moins normal parvient à se former, si l'excision est suivie d'une cicatrisation assez rapide.

Dans tous les cas, l'endoblaste du nœud de Hensen est rejeté du côté dorsal. Le reste du matériel qui le constitue, participe toujours à la formation du corps embryonnaire en fournissant du matériel somitique et chordal, mais peut se différencier partiellement de façon autonome dans de nombreux cas.

SUMMARY

On chick blastoderms cultivated *in vitro* at the complete primitive streak stage, Hensen's node is excised and turned *in situ*, so as to invert its dorso-ventral axis.

In a few cases, Hensen's node was either stained with Nile blue sulphate or marked with animal charcoal.

At this stage, we found that the dorso-ventral axis is already determined. However, in spite of our intervention, we found that a more or less normal, embryo is formed, if the excision is followed by fairly rapid healing.

In every case, the endoblast of Hensen's node is rejected on the dorsal side. The remaining material, which is contained in Hensen's node, always participates in forming the embryonic axis giving rise to notochordal and somitic cells. But in many cases, this same material is capable of autonomous differentiation.

ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Versuche werden an *in vitro* gezuchteten Hühnerembryonen ausgeführt. Es wird das Stadium des ganz verlängerten Primitivstreifens genommen. Wir schneiden den Hensen'sche Knoten heraus und drehen ihn so, dass seine dorso-ventrale Axe umgestellt zu liegen kommt.

In einigen Versuchen, haben wir den Hensen'sche Knoten mit Nilblau gefärbt oder mit Tierkohle markiert.

Wir haben beobachtet, dass dorso-ventrale Axe in diesem Stadium schon bestimmt ist. Wenn auf die Ausschneidung eine schnelle Vernarbung folgt, bildet sich, trotz unseren Eingriffes, ein mehr oder weniger normaler Embryonenkörper.

In allen Fällen, wird der Endoblast des Hensen'schen Knotens auf der dorsale Seite ausgewarfen. Der Rest des Materials nimmt immer an der Bildung des Embryonenkörpers teil und versieht ihn mit Ursegmenten und der Chordaanlage oder kann sich dennoch in vielen Fällen teilweise selbstständig differenzieren.

BIBLIOGRAPHIE

Abercrombie, M. 1950. *The effects of antero-posterior reversal of lengths of the primitive streak in the chick.* Phil. Trans. Roy. Soc. B. 234: 317-338.

Gallera, J. 1964. *Excision et transplantation des différentes régions de la ligne primitive chez le Poulet.* Bull. d'Assoc. des Anat. 49: 632-639.

Gallera, J. et I. Ivanov. 1964. *La compétence neurogène du feuillet externe du blastoderme de Poulet en fonction du facteur « temps ».* J. Embryol. exp. Morph. 12: 699-711.

Grabowski, C. T. 1956. *The effects of the excision of Hensen's node on the early development of the chick embryo.* J. exp. Zool. 133: 301-344.

Modak, S. P. 1965. *Sur l'origine de l'hypoblaste chez les Oiseaux.* Experientia 21: 273.

Nicolet, G. 1965. *Etude autoradiographique de la destination des cellules invaginées au niveau du nœud de Hensen de la ligne primitive achevée de l'embryon de Poulet.* Acta. Embryol. Morph. (sous presse).

Spratt, N. T. 1952. *Localization of the prospective neural plate in the early Chick blastoderm.* J. Exp. Zool. 120: 109-130.

— 1955. *Analysis of the organizer center in the early chick embryo. I. Localization of prospective notochord and somite cells.* J. Exp. Zool. 128: 121-164.

Vakaet, L. 1962. *Some new data concerning the formation of the definitive endoblast in the chick embryo.* J. Embrol. exp. Morph. 10: 38-57.